

**Der serologische Nachweis der Babesia
Divergens-Infektion des Rindes mit der
Immunfluoreszenz, der indirekten
Hämagglutination und dem
Immuno-Enzymtest**

Lothar Reif
München 1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548305_0065

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

DER SEROLOGISCHE NACHWEIS DER BABESIA DIVERGENS-INFEKTION
DES RINDES MIT DER IMMUNFLUORESZENZ, DER INDIREKTEN
HÄMAGGLUTINATION UND DEM IMMUNO-ENZYMTEST

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Lothar Reif
aus
Kamp-Lintfort

München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch

Korreferent: Prof. Dr. P.A. Bachmann

Tag der Promotion: 29. Februar 1980



Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Die Serodiagnostik der Babesiose des Rindes (anhand der Literatur)	2
III. Eigene Untersuchungen	12
A. Material und Methoden	12
B. Ergebnisse	19
1. Antikörperbildung in experimentell mit Babesia divergens infizierten Rindern, dargestellt im IFAT, im IHA und im ELISA . .	19
2. Antikörperpräsenz in Rinderseren aus aus- gewählten Gebieten Südbayerns	25
3. Stufenlose Antikörperbestimmung mit der MONA-ELISA-Technik	29
4. Nachweis der Babesieninfektion des Rindes mit Hilfe eines Intradermaltests	31
IV. Besprechung der Ergebnisse	34
V. Zusammenfassung und Summary	40
VI. Literaturverzeichnis	42
Lebenslauf	

I. Einleitung

Der Nachweis der Babesieninfektion des Rindes stützt sich neben dem jahreszeitlich eng begrenzten Auftreten akuter Erkrankungsfälle mit der typischen klinischen Symptomatik vor allem auf den direkten Erregernachweis im gefärbten Blutaussstrich. Da jedoch in der latenten Phase der Infektion der Erregernachweis oft nicht gelingt, dienen serologische Untersuchungen der Diagnose beim Einzeltier sowie zur Feststellung des Durchseuchungsgrades einer Rinderpopulation.

Ziel meiner Arbeit war es, an experimentell mit *Babesia divergens* infizierten Rindern die Antikörperbildung zu studieren und Titerverlaufskurven im IHA, im IFAT und im ELISA zu erarbeiten. Gleichzeitig sollten Grenztiter bestimmt werden. Die praktische Anwendbarkeit und Aussagekraft der verschiedenen serologischen Methoden wurde anschließend vergleichend an einer größeren Zahl von Rinderseren aus ausgewählten Gebieten Südbayerns überprüft.

Neben dem Nachweis humoraler Antikörper wurde versucht, *Babesia divergens*-Infektionen bei Rindern mit dem Intradermaltest nachzuweisen.

II. Die Serodiagnostik der Babesiose des Rindes (anhand der Literatur)

Über das Vorkommen der Rinderbabesiose in Deutschland berichten erstmalig JACKSCHATH (1901), NEVERMANN (1901) sowie KOSSEL und Mitarb. (1904). Sie weisen in ihren Arbeiten auf den Zusammenhang zwischen Weidehaltung und dem Auftreten der Krankheit hin und beschreiben als typische Babesienbiotope Weiden an Waldrändern und sumpfige Wiesen an Seen.

GOERTTLER (1929) berichtet über die Verbreitung und auch die Bekämpfung der Rinderpiroplasmose. Er fand heraus, daß in einmal verseuchten Bezirken die Erkrankung fast jährlich beobachtet werden kann. Jedoch ist auch in endemisch verseuchten Gebieten (Pommern, Schwarzwald, Oldenburg) die Ansteckungsgefahr räumlich begrenzt, da ideale Lebensbedingungen für Zecken nur auf bestimmten feuchten Weiden herrschen, auf denen Büsche und Bäume stehen.

JACOB (1939) untersuchte die Verbreitung der Rinderbabesiose in Niedersachsen und konnte feststellen, daß nicht sichtlich erkrankte Rinder aus einer verseuchten Gemeinde eine besondere Bedeutung haben, wenn sie in einem bislang seuchenfreien Gebiet mit Zecken in Berührung gelangen. Bei einer klinisch an Weiderot erkrankten Kuh, bei der deutliche Symptome bestanden, konnte er nur bei 8 von 40 angefertigten Blutaussstrichen vereinzelte Piroplasmen nachweisen. Daraus folgert er, daß aufgrund des Nichtauftretens des Erregers im Blutaussstrich nicht auf das Nichtvorhandensein geschlossen werden kann.

ENIGK, FRIEDHOFF und WIRAHADIREDDA (1963) konnten in Norddeutschland neben *B. divergens* auch *B. major* im gefärbten Blutaussstrich nachweisen. In Süddeutschland konnten DENNIG, LEHNER und TEUBNER (1974) bei 4 Rindern aus dem Gebiet des Sylvensteinstausees *B. divergens* nachweisen und isolieren. Aufgrund von Erhebungen bei den Veterinärbehörden durch die Autoren besteht ein Verdacht auf das vereinzelte Vorkommen von Rinderbabesiosen in den Landkreisen Berchtesgaden Land, Bad Tölz, Ingolstadt (Eichstätt), Oberallgäu, Rosenheim, Rottal und Traunstein. Diese Voralpengebiete gelten auch als geeignete Zeckenbiotope; systematische Untersuchungen fehlen aber bisher.

DANAILOV und Mitarb. (1965) beschreiben, daß in der DDR in manchen Gebieten bis zu 40% der Weiderinder befallen sind, bei einer Sterblichkeit von 10-30%. Wie die Autoren mit diesen Zahlen deutlich machen, hat die Babesiose der Rinder in manchen Gebieten eine erhebliche wirtschaftliche Bedeutung. Diese Tatsache wird durch Untersuchungen von JUNGMANN (1966) unterstrichen. Neben den Todesfällen tritt bei der Erkrankung eine zum Teil erhebliche Leistungsminderung ein, die sich in geringerer Zunahme bei Masttieren und Milchrückgang bei Kühen um 15-100% ausdrückt. JUNGMANN (1966) beschreibt weiter, daß mit der Konzentration der Tiere in großen Viehbeständen und Weidekomplexen die Piroplasmose einen anderen Charakter bekommen hat. Während sie früher nur als Einzelerkrankung eine Rolle spielte, stellt sie nun ein Herdenproblem dar. Gleichzeitig lehnt sie eine Schutzimpfung mit dem Blut durchseuchter Kälber streng ab, da hierdurch neue Keimträger geschaffen werden und das Erregerreservoir vergrößert wird. Um einen genaueren Überblick über die Erkrankung zu gewinnen, empfiehlt die Autorin eine Meldepflicht einzuführen. Seit dem 1.4.1966 ist die Rinderbabesiose in der DDR aus diesem Grunde melde- und bekämpfungspflichtig.

Der direkte Erregernachweis bei der Babesiose des Rindes gelingt zuverlässig nur im frischen Stadium der Infektion. In den letzten Jahren wurde deshalb versucht, mit Hilfe verschiedener serologischer Tests spezifische Antikörper gegen Babesien bei latenten Infektionen nachzuweisen (TODOROVIC, 1975).

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) wurde bereits 1945 von HIRATO und Mitarbeitern zum Nachweis einer *B. caballi*-Infektion herangezogen. Dieses Verfahren wurde allerdings von TODOROVIC (1975) als nicht genügend zuverlässig und wenig empfindlich im Vergleich zu anderen Untersuchungsmethoden bezeichnet.

Die Gelpräzipitation wurde von GOLDMANN und BUKOWSKY (1975) zur Diagnose einer Infektion mit *B. bigemina* benutzt. Sie verwendeten sowohl somatisches als auch metabolisches Antigen von *B. bigemina* in ihrem Test, bei dem sich bei einem positiven Ergebnis Präzipitationsbanden zwischen dem Antigen und dem Serum auf einem Agar-Gel bildeten. Bei 85 untersuchten Seren fanden sie in 72% der Fälle eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Seren im IFAT.

Als ein einfacher Feldtest erwies sich der Kapillarröhrchen-Agglutinationstest, der von LÖHR und ROSS (1969) entwickelt wurde. Dabei wird ein solches Röhrchen mit einer bestimmten Menge Antigen und unverdünntem Serum gefüllt. Das Ergebnis ist nach 4-24 Stunden als Agglutination im positiven Fall zu erkennen. Sie untersuchten Seren von 74 aus Europa nach Kenia importierten Rindern vor und nach einer künstlichen Infektion mit *B. bigemina*. Antikörper konnten bei allen Tieren 1-2 Tage nach der Parasitämie festgestellt werden, während sie vor der Vakzinierung nicht nachgewiesen werden konnten.

Von TODOROVIC und KUTTLER (1974) wurde der Babesia Card Agglutination Test eingeführt. Indem 1 Tropfen Antigen (*B. bigemina*) und 2 Tropfen Serum auf einer Karte unter leichter Bewegung gemischt wurde, konnte im positiven Fall nach 5 Minuten eine Agglutination nachgewiesen werden. Die erfaßbaren Antikörper erschienen gleichzeitig mit der Parasitämie und waren bis 12 Wochen p.i. nachweisbar.

Ähnliche Tests wurden von ZUCKERMANN und RISTIC (1968) als Tube-Latex-Agglutinationstest und von LOPEZ und TODOROVIC (1978) als Rapid-Latex-Agglutinationstest eingeführt. Bei beiden Verfahren wurden die verwendeten Antigene an Latex-Partikel adsorbiert und diese als Agglutino gene verwendet. Sie konnten damit Infektionen mit *B. canis* bzw. *B. argentina* nachweisen.

Im wesentlichen haben sich zum Nachweis von Antikörpern gegen Babesien-Arten der indirekte Fluoreszenzantikörpertest (IFAT), der indirekte Hämagglutinationstest (IHA) und in zunehmendem Maße der Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) durchgesetzt. Sie sind in der Spezifität und der Sensitivität den anderen Methoden überlegen und erfassen Antikörper auch noch einen langen Zeitraum nach einer einmaligen Infektion.

Der indirekte Fluoreszenzantikörpertest (IFAT) wurde erstmals von RISTIC und SIBINOVIC (1964) zum Nachweis einer latenten Babesiose

des Pferdes (*B. caballi*) herangezogen. Bei Rindern konnten ROSS und LÖHR (1968) mit dem IFAT Antikörper zwei Jahre lang nach einer *B. bigemina*-Infektion nachweisen. Die Titer erreichten 21 Tage p.i. eine Höhe von 1:1280, fielen schrittweise innerhalb von sechs Monaten ab, waren aber auch nach 18-24 Monaten noch in einer 20- bis 40-fachen Serumverdünnung zu erkennen. DONNELLY, YOYNER und CROSS-MANN (1972) gelang es, mit Hilfe des IFAT die Infektionsrate in einer Herde von Milchkühen nach einem natürlichen Ausbruch einer *B. divergens*-Infektion zu bestimmen. Die Antikörper waren kurz nach Auftreten der Parasitämie im IFAT erkennbar und persistierten über einen langen Zeitraum.

Eine Vergleichsuntersuchung zwischen der KBR und dem IFAT führten TODOROVIC und LONG (1976) durch. An 372 Serumproben von Rindern mit einer natürlichen Infektion mit *B. argentina* bzw. *B. bigemina* stellten sie fest, daß der IFAT empfindlicher ist als die KBR. Der Fluoreszenztest zeigte 4 bzw. 2 Wochen früher als die KBR Antikörper an. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen von PURNELL und Mitarbeiter. (1978), die in ihren Untersuchungen mit der KBR früher Antikörper nachweisen konnten, die aber relativ schnell wieder abfielen. Diese Autoren waren der Meinung, daß die KBR zum Nachweis einer latenten Babesieninfektion weniger geeignet ist, da es hierbei darauf ankommt, Antikörper über einen möglichst langen Zeitraum nach der Infektion zu erfassen.

ADAM und BLEWETT (1978) untersuchten im IFAT Serumproben von 22044 Rindern aus Schottland, von denen insgesamt 11% positiv waren. In manchen Gebieten der Highlands reagierten bis zu 40% der untersuchten Seren positiv. Alle Seren wurden in einer Verdünnung von 1:50 getestet. Als Antigen diente ihnen *B. divergens*, das sie aus entmilzten Kälbern mit einer Parasitämie von 2-30% gewannen. Das Blut wurde im Verhältnis 1:4 mit PBS verdünnt, auf Objektträger aufgetragen und anschließend getrocknet. Eine Reaktion wurde dann als positiv angesehen, wenn der Parasit deutlich leuchtend zu sehen war; als zweifelhaft wurde sie bezeichnet, wenn der Parasit nur undeutlich in seinen Umrissen auszumachen war. Die Autoren können falsch

positive Reaktionen nicht sicher ausschließen. Sie verweisen aber auf die geringe Rate von positiven Ergebnissen bei Seren, die von Rindern stammten, die auf zeckenfreien Inseln lebten.

B. divergens ist nicht wirtsspezifisch für das Rind, sondern Damhirsch, Rothirsch, Reh und Mufflon sind ebenso empfänglich (ENIGK und FRIEDHOFF, 1962). Bei diesen Tierarten kommt es nur zu einem subklinischen Verlauf, ohne daß der Erreger in seiner Virulenz abgeschwächt würde. Die Tiere stellen also ein Erregerreservoir dar. Mit Hilfe von Blutproben auf Filterstreifen könnte aber auch bei schon toten Tieren festgestellt werden, ob eine *Babesien*-Infektion vorlag.

Der indirekte Hämagglutinationstest (IHA) wurde von CURNOW und CURNOW (1967) zur Diagnose einer *B. argentina*-Infektion herangezogen. Der Test war ihrer Meinung nach der KBR gleichwertig; denn in beiden konnten Antikörper über einen Zeitraum von 7 Tagen p.i. bis 22 Monaten p.i. erfaßt werden. Auch GOODGER (1971) gelang im IHA der Antikörpernachweis einer Infektion bei Rindern mit *B. argentina* bzw. *B. bigemina*. Extraktantigene wurden an Schaferythrozyten entweder direkt oder nach Vorbehandlung mit Tanninsäure gekoppelt. Mit diesen Antigenen stellten GOODGER und MAHONEY (1974) bei der Testung nicht infizierter Rinderseren in 2-8% der Fälle falsch positive Reaktionen im IHA fest. Es zeigte sich also, daß bei der Verwendung des homologen gereinigten Antigens immer noch Komponenten des normalen Blutes enthalten sind, die zu Agglutinationen und damit zu falsch positiven Reaktionen führen. Außerdem ergaben sich falsch positive Ergebnisse in 0,6-0,9% der Fälle bei Rinderseren, die mit *Anaplasma marginale*, *Theileria mutans*, *Brucella abortus* und *Leptospira pomona* infiziert waren. Bei Seren, die von mit *B. argentina* infizierten Rindern stammten, zeigte der IHA höhere Titer an als die KBR und der IFAT. Von 22 Tieren, die einer einmaligen Infektion ausgesetzt waren, konnte bei 21 Tieren die Infektion noch 4 Jahre danach festgestellt werden. Gleichzeitig durchgeführte Blutuntersuchungen ließen es nicht mehr zu, Erreger im gefärbten Blutausschlag nachzuweisen.

Nach GOODGER und MAHONEY (1974) ist es für den IHA unerlässlich, die verwendeten Schaferythrozyten zu stabilisieren, um sie für längere Zeit im Kühlschrank zu lagern, tief zu gefrieren oder zu lyophilisieren. Sie verwendeten zur Stabilisierung Pyruvataldehyd. Andere Möglichkeiten werden z.B. von BECHT (1968), von MAYR und Mitarb. (1977) sowie von HERBERT (1967) beschrieben. Um die stabilisierten Erythrozyten mit Antigenen zu beladen, müssen sie zunächst sensibilisiert werden. AVRAMEAS und Mitarb. (1969) und wiederum HERBERT (1967) weisen auf verschiedene Möglichkeiten hin, wobei die Methode mit Tanninsäure als Kopplungsreagenz am längsten bekannt ist. Dabei ist immer noch nicht erforscht, auf welche Art und Weise Tanninsäure die Erythrozyten beeinflusst. HERBERT (1967) vermutet, daß die Rolle der Tanninsäure mit der mancher proteolytischer Enzyme verglichen werden kann. Es ist beobachtet worden, daß frische Erythrozyten zwar in der Lage sind Antigenen zu binden und mit homologen Antikörpern eine Reaktion einzugehen, ohne daß es dabei aber zu einer Agglutination kommt, bevor nicht die Erythrozyten in irgendeiner Weise durch die Aktivität proteolytischer Enzyme an ihrer Oberfläche verändert worden sind. Um die Neigung zur Agglutination auszugleichen, werden vom gleichen Autor verschiedene stabilisierende Substanzen genannt; es sind dies entweder Serum derselben Spezies, von der die Erythrozyten stammen, oder humanes sowie bovines Serumalbumin. Nach GOODGER und MAHONEY (1974) können sensibilisierte und mit Antigenen beladene Erythrozyten bei -70°C 1 Jahr, bei -30°C 3 Monate und bei $+4^{\circ}\text{C}$ 2 Wochen gelagert werden. Bei einer längeren Lagerung tritt Autoagglutination auf.

Mit dem Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) ist von ENGVALL und PERLMANN (1972) ein Test entwickelt worden, der in der Folgezeit zum Nachweis der verschiedensten Infektionen herangezogen worden ist (RUITENBERG und VAN KNAPEN, 1977; VOLLER und Mitarb., 1977; WEILAND, 1978). Zum Nachweis einer Infektion mit *B. divergens* wurde er erstmals von PURNELL und HENDRY (1976) angewendet. 3-6 Tage nach dem Höhepunkt der Parasitämie wurde von ihnen im ELISA (14 Tage p.i.) der maximale Antikörpertiter festgestellt. Als Antigen verwendeten sie ein somatisches Extraktantigen von *B. divergens*.

P-Nitrophenylphosphat diente ihnen als Substrat. Die enzymatische Reaktion wurde nach 30 Minuten durch die Zugabe einer 3 M NaOH gestoppt und der Farbumschlag des Substrats photometrisch bei 405 nm bestimmt. Dabei galt eine Titerstufe dann noch als positiv, wenn die Extinktion höher als 0,350 war; diese Extinktion war die höchste, die von einem Serum eines nicht infizierten Tieres stammte und muß als falsch positive Reaktion bewertet werden. Die Autoren geben ihre Ergebnisse nicht nur in Titerstufen an, sondern auch in Extinktionswerten; die Intensität des Farbumschlags des Substrats ist proportional zur Menge an Antikörpern in einem Serum. 13 Tage p.i. erhielten sie bei 3 experimentell mit *B. divergens* infizierten Rindern eine Extinktion von 0,750 bis 1,120 bei einem unverdünnten Serum. Zwei Monate nach der Infektion lagen diese Werte noch deutlich über dem Grenzwert, sanken dann aber bei 2 von 3 Tieren ab.

BIDWELL und Mitarb. (1978) verglichen den ELISA mit der KBR und dem IFAT. Dabei sind in der KBR Antikörper zwar früher nachzuweisen, sie fallen dann aber stärker ab. Auch wenn zwischen dem IFAT und dem ELISA sich keine wesentlichen Unterschiede ergaben, so ist doch der ELISA bei einer photometrischen Auswertung weniger subjektiv. Im Gegensatz zu diesen Autoren, die Antikörper mit dem homologen Antigen nachwiesen, verwendeten WEILAND und DOHNA (1978) als Antigen *B. rodhaini*, welches eine für Mäuse spezifische Babesienart ist. Es gelang ihnen damit die Feststellung von Babesienantikörpern in Hochimmunseren von Mäusen, Kaninchen und Hunden. KRATZER (1979) wies in ihrer Arbeit nach, daß das somatische *B. rodhaini*-Antigen höhere Titerstufen erbrachte als das metabolische Antigen. Sie konnte ferner den Beweis erbringen, daß Seren von experimentell mit *B. bigemina* infizierten Rindern und mit *B. caballi* infizierten Pferden positiv mit dem *B. rodhaini*-Antigen reagierten. Sie folgert daraus, daß dieses Antigen auch zum Nachweis einer *B. divergens*-Infektion geeignet sein müsse.

Bei vergleichenden fluoreszenz- und enzymserologischen Untersuchungen zum Nachweis der Hundebabesiose gelang WEILAND und KRATZER (1979) sowohl im IFAT als auch im ELISA der Nachweis spezifischer Antikörper.

In der latenten Phase der Infektion, in der mikroskopisch der Erreger nicht mehr nachweisbar war, ergaben sich Serumtiter von 1:40 im IFAT und 1:80 im ELISA. Nach einer diagnostischen Entmilzung konnten sie beweisen, daß die Tiere auch in dieser Phase noch Parasitenträger waren.

Eine neue ELISA-Technik wurde von FELGNER (1978) beschrieben und als "Stick-ELISA" bezeichnet. Anstelle der Polystyrol-Mikrotiterplatten verwendete er Polystyrol-Rührstäbchen als Antigenträger. Dieses Verfahren ist hinsichtlich des Antigen- und Konjugatverbrauchs sparsamer und ermöglicht durch eine Beschleunigung des Waschvorgangs eine schnellere Durchführung des gesamten Tests. Hinsichtlich der Haltbarkeit antigenbeschichteter Polystyrolstäbchen ergaben vorläufige Untersuchungen eine Mindestverwendbarkeit von 2-3 Wochen für die geprüften Antigene.

Da es dem Kliniker oft Schwierigkeiten bereitet, bei der Vielzahl der heutzutage durchgeführten serologischen Tests einen Einzeltiter richtig zu beurteilen, beschreibt FELGNER (1978) eine Methode, bei der die Ergebnisse nicht als Titerstufen, sondern als Vielfaches der normalen Aktivität angegeben werden. Diese Antikörperergebnisse, als MONA (multiple of normal activity) bezeichnet, stellen eine stufenlose Antikörperbestimmung dar, vergleichend gemessen gegen ein normales Sammelserum. Über mehrere Verdünnungsstufen ergibt sich eine annähernd parabolische Beziehung zwischen der Antikörperkonzentration und damit der Menge an umgesetztem Substrat auf der einen Seite und der gemessenen Extinktion andererseits. Die Extinktion eines normalen Sammelserums wird als 1 MONA bezeichnet und aus den dazu gemessenen Extinktionen von Patientenseren wird deren Aktivität als ein Vielfaches der normalen Aktivität errechnet.

Anstelle der 5-Aminosalicylsäure verwendeten AMBROISE-THOMAS und DESGEORGES (1978) Ortho-Toluidin als Substrat für die Peroxydase. Es ergab sich bei ihren Untersuchungen mit 5 verschiedenen Antigenen, daß bei diesem Substrat eine 4-8mal geringere Antigenkonzentration und eine 5fach höhere Verdünnung des Konjugats (1:2000) bei einer

wesentlich kürzeren Inkubationszeit benötigt wird. Sie lasen ihre Ergebnisse photometrisch bei 630 nm ab und erkannten, daß der Unterschied in der Extinktion bei einem positiven und einem negativen Serum mit diesem Substrat deutlicher ist.

Während alle bisher aufgeführten Autoren eine Babesien-Infektion mit Hilfe der verschiedenen serologischen Tests nachgewiesen und das Vorhandensein und die Konzentration spezifischer humoraler Antikörper überprüft haben, führten BANERJEE und Mitarb. (1977) einen Intradermaltest zum Nachweis einer *B. equi*-Infektion durch. Sie verwendeten sowohl somatisches als auch metabolisches *B. equi*-Antigen. 0,1 ml Antigen wurden intrakutan appliziert; nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Hautdicke mit einem Kutimeter gemessen und auf dem Höhepunkt der allergischen Reaktion eine Hautbiopsie durchgeführt. Histologisch zeigte sich ödematöses Gewebe mit einer Ansammlung von mononukleären Zellen. Die Hautdicke nahm bis 24 Stunden p.i. auf mehr als das Doppelte zu. Diese Zunahme veränderte sich bis 72 Stunden p.i. nicht.

URBANECK und ROTHE (1979) weisen darauf hin, daß bei der Immunantwort sowohl humorale Antikörper als auch zellvermittelte Abwehrmechanismen eine Rolle spielen. Manche Bakterienarten und Protozoen sind in der Lage, ihren zellulären Abbau in den Makrophagen zu verhindern und damit eine persistente Infektion zu verursachen. Diese Erreger können sich auch nach der Phagozytose im Makrophagen vermehren. Eine humorale Immunität bleibt infolge der intrazellulären Lokalisation des Erregers trotz möglicher hoher Antikörpertiter wirkungslos. Die Autoren beschreiben weiterhin, daß für den Abbau der intrazellulär gelegenen Erreger eine Makrophagenaktivierung erforderlich ist, die durch eine spezifische T-Zellreaktion ausgelöst wird. Solche spezifisch reagiblen T-Lymphozyten, die nach einem einmaligen Antigenkontakt aus immunkompetenten Zellen entstehen, synthetisieren nach einem erneuten Antigenkontakt bestimmte Mediatoren, die ein Anlocken der Makrophagen an die Stätten der immunreaktiven T-Zellen bewirken, welche sich ihrerseits an dem Erregerherd lokalisieren.

Morphologisch lassen sich in diesen granulomatösen Herden vor allem mononukleäre Zellen, lymphozytoide Zellen und typische Makrophagen nachweisen, wie MACKANESS und BLANDEN (1967) berichten. HAHN (1974) weist darauf hin, daß die humorale Immunität vorwiegend bei frischen Infektionen, die zelluläre Immunität dagegen bei chronischen Erkrankungen vorrangige Bedeutung hat. Die zelluläre Abwehr löst häufig eine Allergie vom Spättyp aus, so daß HAHN (1974) diese als einen Hinweis auf eine vorliegende zelluläre Immunität ansieht.

Mit dem Nachweis einer Babesien-Infektion mit Hilfe eines leicht durchzuführenden Intradermaltests wurde eine Möglichkeit aufgezeigt, die auch für Durchseuchungsuntersuchungen von Bedeutung ist. Aufgrund der Fähigkeit der memory-cells, ein Antigen auch nach Jahren noch wiederzuerkennen und spezifisch zu reagieren, kann eine einmalige Infektion über einen sehr langen Zeitraum nachgewiesen werden.

Neueste Untersuchungen von LEWIS und WILLIAMS (1979) ergaben, daß *B. divergens* auch in Gerbils (*Meriones unguiculatus*) gezüchtet werden kann. Sie infizierten diese Tiere mit einem *B. divergens*-Stamm aus Irland und konnten die Parasiten 3 Tage p.i. im Blutaussstrich nachweisen. Nach einer zweimaligen Passage in Gerbils konnten sie mit dem Blut dieser Tiere, das 5×10^8 Parasiten enthielt, Kälber infizieren.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

Als Versuchstiere standen mir für die Infektionsversuche mit *B. divergens* 3 Rinder zur Verfügung. Es handelte sich um 2 männliche Tiere der Rasse Deutsche Schwarzbunte und ein weibliches Tier der Rasse Deutsches Fleckvieh. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn 4 Monate alt. Da sie im Oktober geboren und immer im Stall gehalten wurden, konnte ich davon ausgehen, daß bei ihnen eine natürliche Infektion mit *B. divergens* nicht vorlag. Über die Versuchsdauer wurden die Tiere in einem Anbindestall mit Einstreu bei einer Raumtemperatur von 18-20°C gehalten und erhielten Wasser und Heu ad libidum.

Zur Antigengewinnung benutzte ich NMRI-Mäuse aus der institutseigenen Zucht. Sie wurden in Makrolonkäfigen bei einer Raumtemperatur von 20°C gehalten. Als Futter erhielten sie Altromin-Mäusestandarddiät und Wasser ad libidum.

Zur Infektion der Rinder verwendete ich den Babesia divergens-Stamm, der von Prof. Dr. Dennig 1973 von an Weiderot erkrankten Rindern aus dem Landkreis Bad Tölz isoliert wurde. Bei jedem Tier setzte ich die Infektion durch Injektion von 100 ml Blut i.v., welches eine Parasitämie von 260% aufwies. Zur Kontrolle des Infektionsverlaufs gewann ich aus der Schwanzspitze einen Bluttröpfchen und fertigte nach Giemsa gefärbte Blutaussstriche an. Jeweils 1000 Erythrozyten zählte ich aus und bestimmte so die Höhe der Parasitämie. Um die Antikörperbildung der Tiere studieren zu können, entnahm ich zunächst täglich, dann dreimal wöchentlich und ab der 10. Woche p.i. nur noch einmal in der Woche Blut aus der V. jugularis und gewann das Serum.

Durch eine diagnostische Entmilzung führte ich den Nachweis, daß in der latenten Phase der Infektion, in welcher Erreger im gefärbten Blutaussstrich nicht mehr nachzuweisen sind, die Tiere trotzdem noch Parasitenträger sind. Aus diesem Grunde wurde Rind 2 am 11. Tag p.i. und Rind 1 am 164. Tag p.i. entmilzt. Für die Durchführungen der Entmilzungen möchte ich Herrn Prof. Dr. Fritsch (Chirurgische Tierklinik) danken.

Um den Einfluß einer Therapie auf den Antikörpertiter kennenzulernen, behandelte ich Rind 1 und Rind 3 am 177. Tag p.i. mit jeweils 7,5 mg/kg Berenil und wiederholte diese Behandlung am 179. und 181. Tag p.i. Am 243. Tag p.i. infizierte ich jeweils 3 Gerbils mit 0,3 ml Blut meiner 3 Rinder und überprüfte, ob eine Infektion dieser Tiere mit dem Blut von dem nicht behandelten Rind 2 möglich ist und ob bei den beiden anderen Rindern durch die Berenil-Therapie eine Sterilisatio magna erreicht wurde.

Zur Antigengewinnung züchtete ich *B. rodhaini* in NMRJ-Mäusen. Jede Maus wurde mit 0,3 ml parasitenhaltigem Mäuseblut i.p. infiziert. Das Infektionsmaterial stammte aus Mäusen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Parasitämie von 800% aufwiesen. Zur Kontrolle des Infektionsverlaufs entnahm ich täglich Blut aus der Schwanzspitze und fertigte nach Giemsa gefärbte Blutaussstriche an. Die infizierten Mäuse wurden auf dem Höhepunkt der Parasitämie 6 Tage p.i. getötet und unter Zusatz von physiologischer Natriumzitratlösung (3,8%) geblutet.

Zur Gewinnung eines somatischen Extraktantigens wurden die Babesien durch Aqua dest.-Hämolyse freigesetzt. Hierzu versetzte ich 1 Teil Blut mit 9 Teilen Aqua dest. und stellte die Isotonie nach einer Minute durch Zugabe eines gleichen Volumens doppelt physiologischen Phosphatpuffers wieder her. Das Hämolysat zentrifugierte ich 20 Minuten bei 13000 Upm ($= 19.942\text{ g}$) und $+4^{\circ}\text{C}$ in einer Sorvall RC 28 Zentrifuge mit einem SS 34 Rotor. Der Überstand wurde verworfen und der Bodensatz, der aus geplatzten Erythrozyten sowie Leukozyten und Babesien bestand, in wenig PBS gelöst und eingefroren. Nach mehrmaligem Frieren und Auftauen wurden die Babesien durch Ultraschall zerstört und mit PBS extrahiert (Sonifier^R-B 12, Fa. Branson Sonic Power Company, Ausgangsleistung 40-60 Watt).

Zur weiteren Aufarbeitung trennte ich die somatischen Extraktantigene säulenchromatographisch auf. Es wurde von mir dazu das Ultrogel Ac A 22 (Fa. LKB) mit einem effektiven Fraktionierungsbereich für

globuläre Proteine eines Molekulargewichts von 100.000-1.200.000 verwendet. Die Gelbetthöhe betrug 50 cm mit einem Durchmesser von 2,5 cm. Als Elutionsflüssigkeit diente entlüftetes PBS mit pH 7,2. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 13 ml pro Stunde. Die Elutionskurven wurden nach Messung bei 254 nm im Uvicord II (Fa. LKB) geschrieben und die Fraktionen automatisch im Ultro Rac (Fa. LKB) gesammelt. Anschließend wurden die Fraktionen für 24 Stunden dialysiert. Das Dialysat bestand aus 1 Teil doppelt physiologischem PBS und 9 Teilen Aqua dest.. Zur Aufbewahrung wurden die Fraktionen lyophilisiert. Die Eiweißbestimmung der Antigenfraktionen führte ich nach der Methode von FOLIN-CIOCALTEAU modifiziert nach LOWRY durch.

Zur Gewinnung des serumlöslichen oder metabolischen Antigens zentrifugierte ich das babesienhaltige Zitratblut ebenfalls bei 13.000 Upm. Das Plasma wurde dann säulenchromatographisch fraktioniert, dialysiert und lyophilisiert.

Bei der Durchführung der serologischen Methoden verwendete ich im IHA und im ELISA jeweils die fraktionierten somatischen und metabolischen Antigenfraktionen von *B. rodhaini*.

Als Antigen für den Fluoreszenztest (IFAT) verwendete ich *B. rodhaini*-haltiges Mäuseblut, das eine Parasitämie von 500% aufwies. Das Antigen wurde verdünnt und in die Aussparungen der beschichteten Fluoreszenzobjektträger (Fa. H. Höpfl) durch Auftropfen und Absaugen aufgetragen und auf einer Heizplatte für 5 Minuten bei etwa 60°C hitzefixiert. Die Serumverdünnungen für den IFAT von 1:10, 1:20, 1:40 usw. stellte ich in Mikrotiterplatten her. Auf jedes der mit Antigen beschichteten Reaktionsfelder auf den markierten Objektträgern wurden 0,025 ml der entsprechenden Serumverdünnung aufgetragen und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wusch ich die Objektträger dreimal 5 Minuten in PBS (pH 7,2). Das mit FITC gekoppelte Antiglobulin (Anti-Bovine Immunglobulin, FITC, IgA, IgG₁, IgG₂, IgM; Fa. Paesel) verdünnte ich im Verhältnis 1:30 mit PBS und

setzte Evans Blue zur Gegenfärbung zu. 0,01 ml des Konjugats wurde auf jedes Reaktionsfeld pipettiert. Es folgte eine halbstündige Inkubation bei 37°C und ein dreimaliges Waschen in PBS. Zur Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop (Orthoplan, Fa. Leitz, Auflicht-Fluoreszenz) wurden die Objektträger mit Glycerin eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte bei einer 6,3 x 40fachen Vergrößerung. Als positiv wurde ein Ergebnis dann angesehen, wenn der Parasit als deutlich leuchtendes Körperchen in den Erythrozyten auszumachen war.

Beim indirekten Hämagglutinationstest (IHA) benutzte ich jeweils die Fraktionen 2 des somatischen und des matabolischen B. rodhaini-Antigens. KRATZER (1979) hatte in ihrer Arbeit bewiesen, daß diese Fraktionen die stärkste Antigenität besitzen. Beim IHA werden die Antigene an Schaf-Erythrozyten gekoppelt. Die von mir verwendeten Schaf-Erythrozyten der Fa. Behring wurden mit Formalin stabilisiert, 25 ml gepackter Erythrozyten in 200 ml PBS (pH 7,2) resuspendiert. 50 ml Formalin (40% Formaldehyd) wurden in einen Dialyseschlauch gefüllt und dieser so verknotet, daß die Flüssigkeit nur 2/3 des Schlauches einnahm. Dies erlaubt eine Expansion des Volumens aufgrund des osmotischen Effekts. Der gefüllte Dialyseschlauch wurde in die Erythrozytensuspension gelegt und die Suspension 3 Stunden leicht gerührt. Anschließend punktierte ich den nun angeschwollenen Dialyseschlauch und bewegte die Suspension für 12 Stunden auf einem Magnetrührer. Danach erfolgte ein 5maliges Waschen der Flüssigkeit mit PBS oder Aqua dest., um das Formalin zu entfernen. Zum Schluß wird eine 50%ige Erythrozytensuspension in PBS hergestellt, der Natriumazid zugesetzt wird.

Die Erythrozyten wurden anschließend je nach Bedarf sensibilisiert. Zu einer 5%igen Erythrozyten-Suspension setzte ich das gleiche Volumen in PBS gelöstes Tannin in einer Verdünnung von 1:5000 zu. Die Mischung wurde für eine halbe Stunde auf einem Taumelgerät bei 37°C gehalten und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Zur Beladung mit Antigen wurden die Erythrozyten in PBS resuspendiert und das gleiche Volumen der säulenchromatographisch aufgetrennten Fraktion von

B. rodhaini zugesetzt. Dabei betrug die Proteinkonzentration 0,5 mg/ml. Es folgte eine halbstündige Inkubation dieser Mischung bei 37°C auf einem Taumelgerät. Um den agglutinierenden Effekt der Tanninsäure auszugleichen, verwendete ich nun beim Waschen der Erythrozyten einen Phosphatpuffer mit 1% bovinem Serumalbumin und suspendierte die mit Antigen beladenen roten Blutzellen zum Gebrauch in einer 0,5-bis 1%igen Konzentration in PBS-BSA.

Die Durchführung des IHA erfolgte in Mikrotiterplatten der Firma Cooke. Als Puffer diente PBS-BSA. Nachdem die Seren für eine halbe Stunde bei 56°C inaktiviert waren, pipettierte ich 0,025 ml eines jeden Serums in die 1. Reihe der Reaktionsplatten und stellte eine Verdünnungsreihe von 1:4, 1:8, 1:16 usw. her. Zu diesen verdünnten Seren gab ich 0,025 ml der 0,5- oder 1%igen Erythrozytensuspension.

Als Kontrollen wurden nicht mit Antigen beladene sensibilisierte Erythrozyten, mit Antigen beladene Erythrozyten ohne Serum sowie ein positives und ein negatives Kontrollserum verwendet. Eine Reaktion bewertete ich auch dann noch als positiv, wenn sich um einen zentralen agglutinierten Erythrozytenschleier ein erythrozytärer Randsaum gebildet hatte. Die negativen Kontrollen zeigten den für den IHA typischen Erythrozytenknopf. Die mit Antigen beladenen Erythrozyten wurden zum Teil tiefgefroren und lyophilisiert, um ihre Haltbarkeit zu prüfen. Nach dem Auftauen bzw. Auflösen führte ich den IHA mit ihnen in der gleichen Weise durch. Außerdem verwendete ich für den IHA die Fraktion 2 des somatischen B. divergens-Antigens. Die Kopplung an die Erythrozyten erfolgte mit der gleichen Tannin- und Proteinkonzentration wie beim heterologen Antigen.

Während beim IHA die Erythrozyten mit Antigen beladen werden, heften sich die Antigene beim Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) unspezifisch an die Polystyrolwände der Mikrotiterplatten. Die Beschichtung dieser Platten (Immulon, Mikroelisa der Fa. Flow) erfolgte in einer Eiweißkonzentration der Antigene von 20 µg/ml. In jede Vertiefung der Polystyrolplatten wurden 0,05 ml Antigenlösung (mit PBS

pH 7,2 verdünnt) einpipettiert, 3 Stunden bei 37°C auf einem Taumelgerät inkubiert und anschließend über Nacht in einen Kühlschrank gestellt. Die Antigensuspension wurde mit Leitungswasser ausgewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Anlagerungen von Serumglobulinen an die Polystyrolwände verwendete ich als Puffer 0,5%iges Humanalbumin in Phosphatpuffer (pH 7,2) mit 0,05%igem Tween-20. Zu 0,075 ml Puffer gab ich 0,025 ml unverdünntes Serum hinzu und stellte mit Mikrodilutern eine Serumverdünnungsreihe von 1:4, 1:8, 1:16 usw. her. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C auf einem Taumelgerät und gründliches Auswaschen mit Leitungswasser. Das mit Meerrettichperoxydase gekoppelte Antiglobulin (Rabbit-Anti-bovine-Globulin-P0; IgG₁, IgG₂ der Fa. Paesel) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in einem Phosphatpuffer mit 4% Humanalbumin und 0,05% Tween-20 verwendet. Durch die Zugabe von Humanalbumin in dieser Konzentration konnten unspezifische Anlagerungen des Antiglobulins an die Polystyrolwände verhindert werden. In jede Vertiefung wurden 0,05 ml dieser Suspension pipettiert und nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C auf einem Taumelgerät gründlich mit Leitungswasser ausgewaschen. Durch die anschließende Zugabe des Substrats entstand bei einer positiven Reaktion ein brauner bis violetter Farbumschlag, der sich nach einer Stunde visuell und photometrisch beurteilen ließ. Das Substrat bestand aus einer bei 70°C in Aqua dest. gelösten 0,08% 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure, die mit 1 N NaOH vor Gebrauch auf pH 6 eingestellt und im Verhältnis 1:10 mit 0,05%igem Wasserstoffperoxyd vermischt wurde. Die Reaktion des Enzyms wurde nach einer Stunde durch Zugabe von 0,05 ml 1 N NaOH abgestoppt. Die photometrische Bestimmung der Extinktionen erfolgte in einem Titertek^R-Multiskan bei 405 nm mit automatischem Ausdruck der Werte.

Neben einer Bestimmung der Antikörperkonzentration in Titerstufen führte ich eine stufenlose Antikörperbestimmung mit der ELISA-Technik durch und drückte die Ergebnisse, wie von FELGNER (1978) beschrieben, als Vielfaches normaler Aktivität (MONA) aus. Rinderseren, die im ELISA eine negative Reaktion zeigten, wurden als negatives Sam-

melserum verwendet und dessen Extinktion mit den Extinktionen verschiedener Serumverdünnungen eines positiven Standardserums verglichen. Anschließend erfolgte rechnerisch die Umwandlung des Extinktionswerts eines unbekannten Serums in das Vielfache der normalen Aktivität.

Für den Intradermaltest verwendete ich nicht fraktionierte somatische und metabolische Antigene von *B. rodhaini* und *B. divergens*. Zur Kontrolle der spezifischen allergischen Reaktion kamen nicht infizierte Mäuse- und Rindererythrozyten und Serum von nicht infizierten Rindern und Mäusen sowie PBS zum Einsatz. Bei den zu untersuchenden Rindern wurde in der Halsregion eine genügend große Fläche geschoren und mit Alkohol desinfiziert. Jedes Antigen applizierte ich in einem Volumen von 0,1 ml intrakutan. Die Hautdicke wurde vor der Injektion, dann für 8 Stunden stündlich und weiter in einem Abstand von 12 Stunden mit einem Kutimeter gemessen.

8. Ergebnisse

1. Antikörperbildung in experimentell mit Babesia divergens infizierten Rindern, dargestellt im IFAT, im IHA und im ELISA

Bei den mir zur Verfügung stehenden 3 Rindern gelang mir jeweils am 2. Tage p.i. der Nachweis des Erregers im gefärbten Blutaussstrich, bei Rind 1 vom 2.-8. Tag p.i.. Der Höhepunkt der Parasitämie wurde am 5. Tag p.i. mit 47% erreicht. Nach einer diagnostischen Entmilzung am 164. Tag p.i. konnten die Parasiten 8 Tage später wieder nachgewiesen werden. Die Parasitämie erreichte eine Höhe von 37% und bestand für 7 Tage. Nach der Therapie mit $3 \times 7,5$ mg/kg Berenil war eine Rückisolierung von *B. divergens* nicht mehr möglich.

Bei Rind 2 waren am 4. Tag p.i. 50 von 1000 Erythrozyten befallen. Nach der Entmilzung am 11. Tag p.i. konnte ich 7 Tage später wieder Parasiten im Blutaussstrich entdecken. Am 21. Tag p.i. betrug die Parasitämie 103% und fiel dann bis zum 27. Tag p.i. schrittweise ab. Bis Versuchsende konnte ich den Erreger im Blutaussstrich nicht mehr feststellen. Bei einer Infektion von 3 Gerbils mit jeweils 0,3 ml Blut dieses Rindes stellte sich bei diesen Versuchstieren eine Parasitämie am 4. Tag p.i. ein und erreichte eine Höhe von 500% am 9. Tag p.i.. Die Gerbils starben am darauffolgenden Tag.

Vom 2.-7. Tag p.i. waren bei Rind 3 die Parasiten im Blutaussstrich bei einer maximalen Parasitämie von 53% am 4. Tag auffindbar. Auch bei diesem mit Berenil behandelten Tier verlief die Infektion von Gerbils negativ.

Mit der Fraktion 2 des somatischen *B. rodhaini*-Antigens gelang mir sowohl im IHA als auch im ELISA der Nachweis von Antikörpern. Auch im indirekten Fluoreszenztest konnte ich mit dem *B. rodhaini*-Antigen die Immunantwort des Wirtsorganismus feststellen. Mit Hilfe dieser 3 Tests erstellte ich Titerverlaufskurven.

In allen 3 Tests konnte ich bis 5 Tage p.i. keine Antikörper nachweisen. Danach stiegen bei Rind 1 (Abb. 1) die Titer auf 1:320 am 10. Tag p.i. im IFAT und 1:128 am 13. Tag p.i. im IHA. Der Maximaltiter wurde

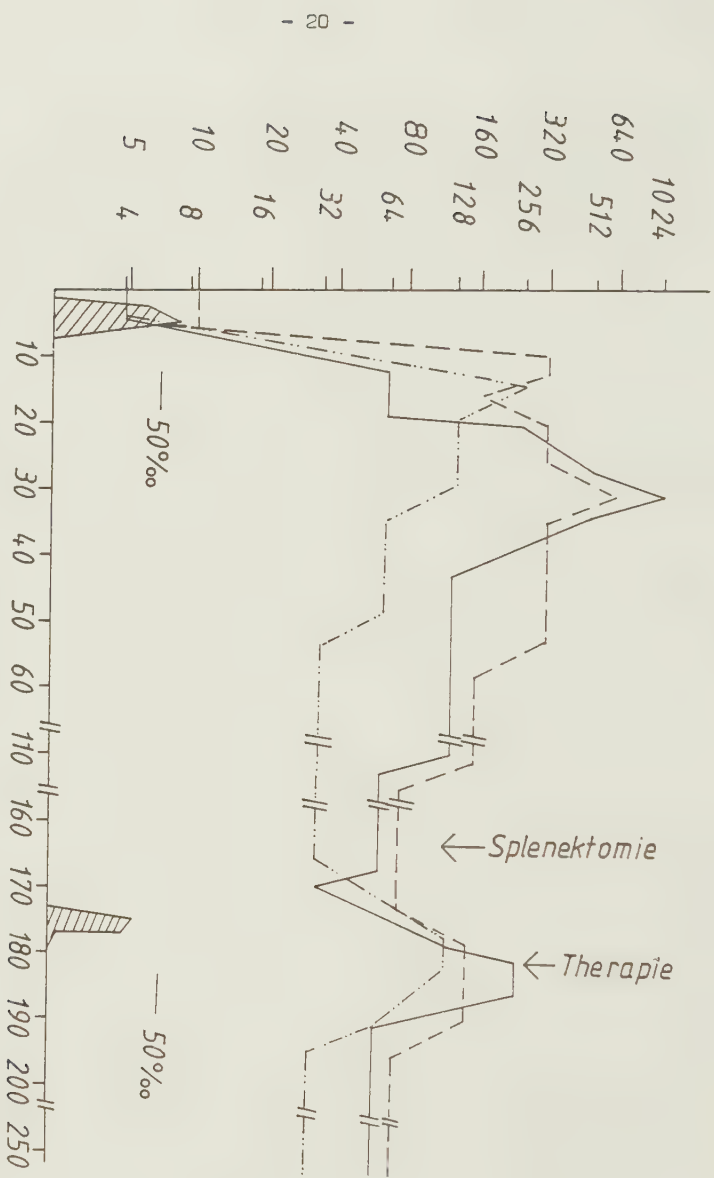


Abb. 1: Parasitämie- und Antikörperverlauf bei dem experimentell mit *Babesia divergens* infizierten Rind 1 nach einmaliger Infektion, Splenektomie und Therapie

ELISA ———, IFAT ———, IHA ———

Tage p.i.

im IFAT am 33. Tag p.i. mit 1:640 erreicht. Im ELISA blieben die Ergebnisse bis zum 20. Tag p.i. mit 1:64 niedrig, um dann steil anzusteigen und am 34. Tag p.i. eine Höhe von 1:1024 zu erreichen. Bis zum 164. Tag p.i. fielen die Titer in allen 3 Tests schrittweise ab, blieben aber im IFAT in einer Höhe von 1:80, im ELISA bei 1:64 und im IHA bei 1:32 erhalten. Nach der diagnostischen Entmilzung und der anschließenden Parasitämie stiegen die Titer in allen 3 Tests um 1-2 Titerstufen an und pendelten sich nach der Therapie in den oben genannten Titerstufen ein.

Auch bei Rind 2 konnte ab dem 5. Tag p.i. die Antikörperbildung beobachtet werden. Die Maximaltiter wurden im IFAT mit 1:320 und im IHA mit 1:128 am 28. Tag p.i. erreicht, während der höchste Titer im ELISA am 30. Tag p.i. mit 1:512 festgestellt wurde (Abb. 2). Im IFAT blieben Antikörper für lange Zeit in einer 160-fachen Verdünnung des Serums nachweisbar, später sank dieser Wert um eine Titerstufe. Die Ergebnisse des IHA schwankten zwischen 1:32 und 1:64, während im ELISA der Titer erst am 65. Tag p.i. von 1:128 um eine Titerstufe abfiel und sich bei 1:64 stabilisierte.

Bei Rind 3 konnte die Antikörperbildung im IFAT vom 5. Tag p.i. an verfolgt werden, während der ELISA und der IHA erst am 7. Tag p.i. positiv reagierten. Der IFAT erreichte am 20. Tag p.i. eine Höhe von 1:640 und fiel dann schrittweise bis zum 250. Tag p.i. auf 1:80 ab. Der Maximaltiter im ELISA wurde von mir am 17. Tag p.i. mit 1:256 festgestellt; über den weiteren Untersuchungszeitraum schwankten die Ergebnisse in diesem Test zwischen 1:128 und 1:64 und stabilisierten sich ab dem 82. Tag p.i. bei 1:64. Der IHA erreichte am

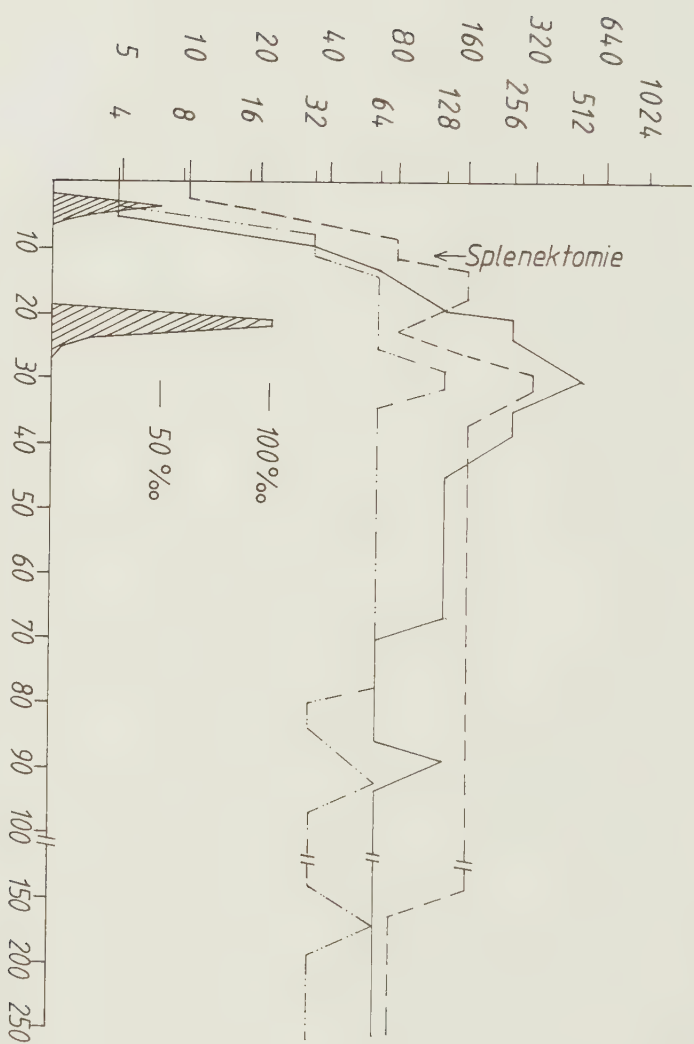


Abb. 2: Parasitämie- und Antikörpertiter-Verlauf bei dem experimentell mit *Babesia divergens* infizierten Rind 2

ELISA ———, IFAT ———, ThA ———

Tage p.i.

12. Tag p.i. eine Höhe von 1:128, sank dann auf 1:32 am 18. Tag p.i. ab und lag während der Versuchsdauer nur mit einzelnen Ergebnissen eine Titerstufe höher (Abb. 3).

Anhand der Ergebnisse bei den experimentell mit *Babesia divergens* infizierten 3 Rindern setzte ich für die Beurteilung der Feldseren für den ELISA 1:64 und für den IHA 1:32 als Grenztiter fest. Neben dem heterologen Antigen konnte ich auch mit dem homologen Antigen im IHA Antikörper nachweisen. Die Fraktion 2 des *B. divergens*-Antigens erbrachte dabei die gleichen Ergebnisse im IHA wie das *B. rodhaini*-Antigen. Bei der Untersuchung der Feldseren mit dem *B. divergens*-Antigen im IHA setzte ich ebenfalls 1:32 als Grenztiter ein.



Abb. 3: Parasitämie- und Antikörpertiter-Verlauf bei dem experimentell mit Babesia divergens infizierten Rind 3 nach einmaliger Infektion und Therapie
ELISA ———, IFAT ———, IHA ———

2. Antikörperpräsenz in Rinderseren aus ausgewählten Gebieten Südbayerns

Insgesamt 1291 Rinderseren wurden von mir im ELISA und im IHA untersucht. Als Antigen im IHA verwendete ich einmal *B. rodhaini*, zum anderen *B. divergens*. Zur Unterscheidung nenne ich diese Untersuchungsmethoden im folgenden IHA-rodh. und IHA-div..

Positiv in mindestens einem der 2 Tests mit homologem bzw. heterologem Antigen reagierten 463 von 1291 Seren (35,9%). Dabei erwiesen sich 336 (26,0%) als positiv im ELISA, 313 (24,2%) als positiv im IHA-rodh. und 298 (23,1%) im IHA div. (Tabelle 1).

Untersuchte Seren: 1291	ELISA		IHA-rodh.		IHA-div.	
	Titer	Anzahl	Titer	Anzahl	Titer	Anzahl
negativ (unter Grenztiter)	<1:64	955	<1:32	978	<1:32	993
positiv			1:32	197	1:32	210
	1:64	240	1:64	89	1:64	66
	1:128	72	1:128	15	1:128	15
	1:256	20	1:256	6	1:256	6
	1:512	4	1:512	6	1:512	1
gesamt positiv		336		313		298

Tab. 1: Anzahl der von 1291 im ELISA und im IHA-rodh. bzw. IHA-div. negativ und in den einzelnen Titerstufen positiv reagierenden Rinderseren

Von den 1291 Rinderseren waren 169 (13,1%) in allen 3 Untersuchungsmethoden, 276 (21,4%) in mindestens zweien positiv. 187 Seren (14,5%) reagierten nur mit einer Methode positiv. Es entfielen davon auf den ELISA 59 Seren (4,6%), auf den IHA-rodh. 69 (5,3%) und auf den IHA-div. 59 Seren (4,6%). Übereinstimmungen mit dem ELISA ergaben sich mit IHA-rodh. bei 85%, mit IHA-div. bei 82,5% der untersuchten Feldseren. Zwischen den mit verschiedenen Antigenen durchgeführten IHA's beträgt die Übereinstimmung 77,8%.

Der Vergleich der Ergebnisse der positiven Seren erbrachte, daß von 313 im IHA-rodh. positiv reagierenden Seren 165 (52,7%) auch in den beiden anderen Tests positiv waren. 66 Seren (21,0%) stimmten mit den ELISA-Ergebnissen, 22 (7,0%) nur mit den Ergebnissen des IHA-div. überein.

Die Auswertung des IHA-div. ergab bei 165 (55,4%) von 298 Seren eine Übereinstimmung mit den beiden anderen Tests; 50 Seren (16,8%) stimmten nur mit dem ELISA und 22 (7,3%) nur mit dem IHA-rodh. überein. Bei einer Gegenüberstellung der Rinderseren, die im ELISA unter dem Grenztiter von 1:64 lagen und als negativ beurteilt wurden, mit den entsprechenden Ergebnissen dieser Seren im IHA-rodh. bzw. im IHA-div. zeigt sich, daß von den 955 Seren 872 bzw. 873 auch in den anderen beiden Tests negativ waren. Dagegen reagierten 81 bzw. 79 Seren im IHA in den unteren positiven Titerstufen (1:32 und 1:64) positiv, während nur 2 bzw. 3 Seren in den beiden nächsthöheren Verdünnungsstufen als positiv beurteilt wurden. Von den im ELISA bei der Verdünnung von 1:128 positiv beurteilten 72 Rinderseren reagierten 25 im IHA-rodh. und 19 im IHA-div. negativ. 47 bzw. 53 dieser 72 Seren reagierten dagegen in Titerstufen von 1:32 bis 1:512 (Tabelle 2).

ELISA		IHA-rodh.		IHA-div.	
Titer	Anzahl	Titer	Anzahl	Titer	Anzahl
< 1:64	955	< 1:32	872	< 1:32	873
		1:32	65	1:32	51
		1:64	16	1:64	28
		1:128	1	1:128	-
		1:256	1	1:256	3
1:64	240	< 1:32	96	< 1:32	83
		1:32	112	1:32	108
		1:64	20	1:64	37
		1:128	7	1:128	9
		1:256	4	1:256	2
1:128	72	1:512	1	1:512	2
		< 1:32	25	< 1:32	19
		1:32	22	1:32	31
		1:64	23	1:64	13
		1:128	1	1:128	6
1:256	20	1:256	1	1:256	1
		1:512	-	1:512	2
		< 1:32	-	< 1:32	4
		1:32	9	1:32	5
		1:64	5	1:64	9
1:512	4	1:128	6	1:128	-
		1:256	-	1:256	-
		1:512	-	1:512	2
		1:32	2	1:32	2
		1:64	2	1:64	2

Tab. 2: Anzahl der Rinderseren, die im ELISA in den verschiedenen Titerstufen reagierten und die dazugehörigen Titer dieser Seren im IHA-rodh. und im IHA-div.

Vergleichende Untersuchungen von Seren aus 7 Landkreisen Südbayerns zeigten, daß im Landkreis Bad Tölz 43,9% der getesteten Seren positiv in einem der 3 Tests reagierten. Es war dies das höchste Ergebnis in den einzelnen Landkreisen. Werden nur die Ergebnisse berücksichtigt, bei denen Rinderseren in 2 Tests bzw. in allen 3 Tests positiv reagierten, ergeben sich für diesen Landkreis 26,0 bzw. 12,6% (Tabelle 3).

Landkreis	Anzahl der Seren unter- sucht positiv		pos. in einem der 3 Tests in %	pos. in 2 Tests in %	pos. in 3 Tests in %
Bad Tölz	230	101	43,9	26,0	12,6
Rottal-Inn	170	74	43,5	22,3	11,2
Oberallgäu	260	109	41,9	26,5	18,5
Berchtes- gadner Land	80	27	33,8	20,0	11,2
Traunstein	240	74	33,6	16,8	10,5
Rosenheim	190	62	32,6	19,5	13,2
Eichstätt	50	16	32,0	16,0	14,0

Tab. 3: Anzahl der untersuchten Rinderseren aus 7 Landkreisen und Anzahl der Reagenten, die in einem der 3 Tests, in zweien oder in allen 3 Tests positiv reagierten

Aus 129 Betrieben der verschiedenen Landkreise lagen mir jeweils 10 Seren zur Untersuchung vor. Dabei konnte ich bei Rinderseren aus 18 Betrieben keine Antikörper gegen B. divergens feststellen. Aus den anderen 111 Betrieben reagierte eine unterschiedliche Anzahl der Tiere (2-9 von 10 untersuchten Seren) positiv. Aus 2 Betrieben reagierten alle Seren positiv.

3. Stufenlose Antikörperbestimmung mit der MONA-ELISA-Technik

Bei der Bestimmung der Antikörperkonzentration als Vielfaches der normalen Aktivität (MONA, multiple of normal activity) setzte ich ein Serum als pathologisches Standardserum ein, das im ELISA einen Titer von 1:1024 aufwies. Bei diesem ergaben sich in mehreren Versuchsansätzen im Mittel die in Tabelle 4 dargestellten Extinktionen.

Titer 1:	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
E.	0,565	0,434	0,295	0,212	0,175	0,155	0,145	0,134	0,121	0,096

Tab. 4: Extinktionswert des pathologischen Standardserums in den einzelnen Verdünnungsstufen

Die Werte variierten in den unteren Titerstufen um $\pm 0,050$, während sich bei den höheren Verdünnungen nur geringe Abweichungen zeigten. Zur Bestimmung eines normalen Standardserums verglich ich die Extinktionswerte der Seren miteinander, die weder im ELISA noch im IHA und im IFAT reagierten. Als maximale Extinktion ergab sich hierbei in den verschiedenen Verdünnungsstufen ein Wert von 0,100. Anhand dieser Ergebnisse konnte ich für die Bestimmung der MONA-Werte die in Abb. 4 dargestellte Eichkurve aufstellen.

Zur Berechnung der MONA-Werte muß zunächst der Exponential-Koeffizient n nach der Formel $n = \frac{\log. \text{DIL-F}}{\log. E_{\text{PST}} - \log. E_{\text{PST-DIL}}}$ errechnet werden, wobei der Verdünnungsfaktor (DIL-F) mit der Extinktion des pathologischen Standardserums (E_{PST}) und einer Verdünnung dieses Serums ($E_{\text{PST-DIL}}$) herangezogen werden. Es ergab sich für n ein Mittelwert von 3,5; dabei schwankten die Werte für die einzelnen Verdünnungsstufen von 3,4-3,7. Nach der Gleichung $n (\log. E_{\text{UKS}} - \log. E_{\text{NST}}) = \log. \text{MONA}_{\text{UKS}}$ wird anschließend der MONA-Wert des pathologischen Standardserums errechnet.

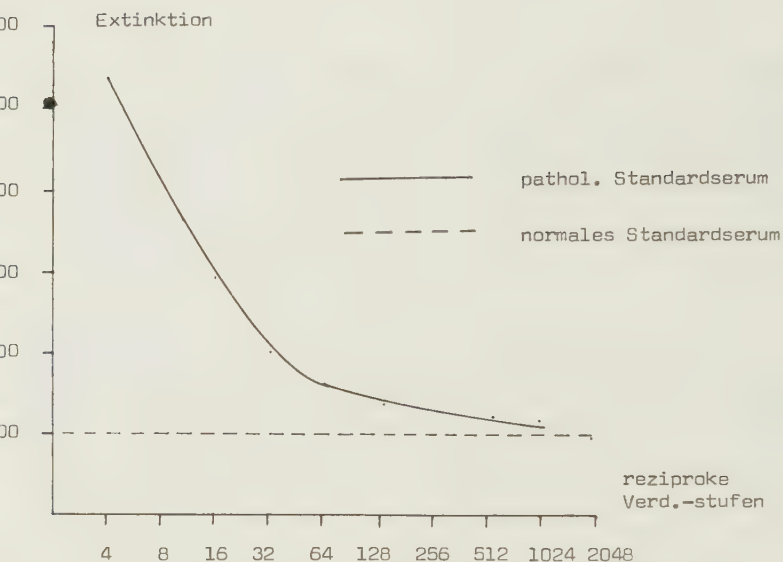


Abb. 4: Titration des pathologischen Standardserums eines experimentell mit *Babesia divergens* infizierten Rindes (in Verdünnungsstufen 1:4 bis 1:2048) mit den dazugehörigen Extinktionswerten im Vergleich mit der maximalen Extinktion eines titrierten normalen Standardserums

(E_{UKS} = Extinktion eines unbekannten Serums; E_{NST} = Extinktion des normalen Sammelserums). Es ergab sich hierbei ein Wert für $\log. MONA_{UKS}$ von $\log. 2,632 = 427,5$. Den logarithmischen Wert setzte ich als $\log. MONA_{PST}$ ein. Die Aktivität eines unbekannten Serums errechnet sich im folgenden dann nach der Gleichung

$$n (\log. E_{UKS} - \log. E_{PST}) + \log. MONA_{PST} = \log. MONA_{UKS}$$

Ich verglich daraufhin die Titerstufen der von mir im ELISA getesteten 1291 Feldseren und der 200 Seren meiner experimentell infizierten Rinder mit den Extinktionswerten und den dazugehörigen $MONA$ -Werten (Tabelle 5).

Titer	Extinktion	MONA
<1:64	< 0,100	<1,00
1:64	0,104-0,187	1,14- 8,96
1:128	0,170-0,260	6,40- 28,35
1:256	0,244-0,332	22,70- 66,65
1:512	0,298-0,407	45,40-136,00

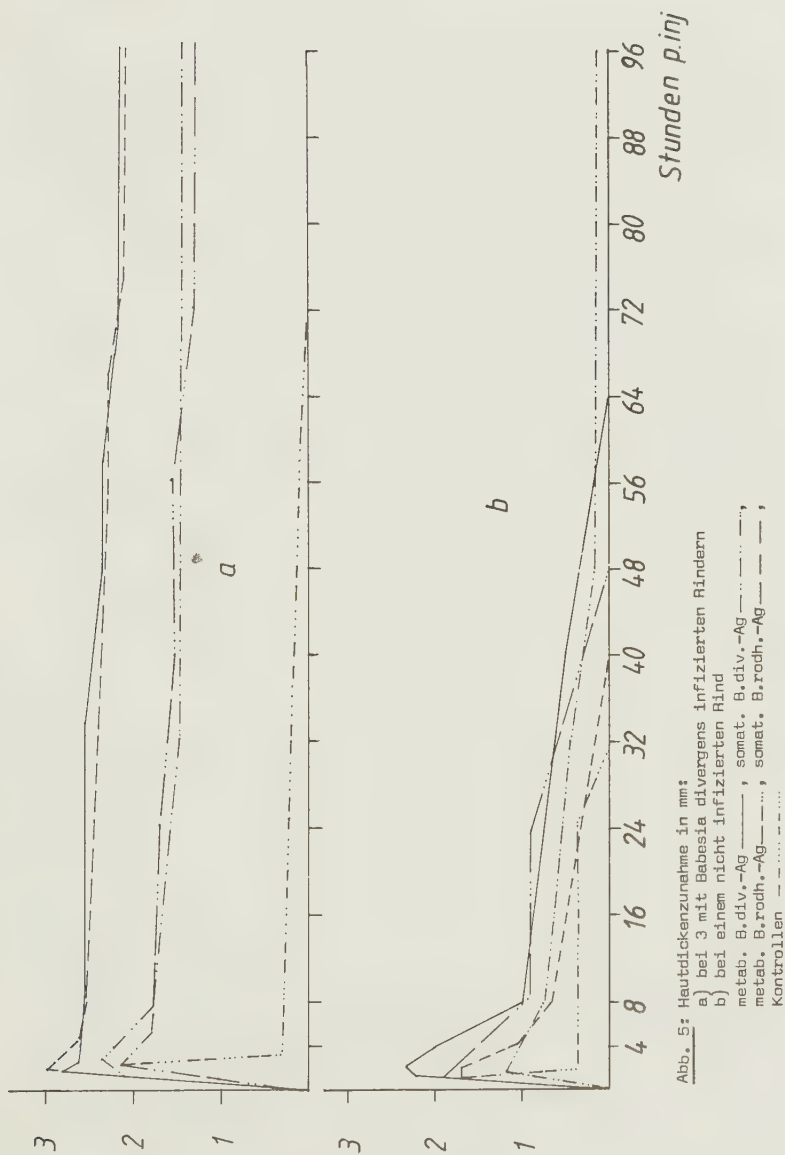
Tab. 5: Gegenüberstellung der Titer und der entsprechenden Extinktions- bzw. MONA-Werte sämtlicher untersuchten positiven und negativen Seren im ELISA

Die Extinktionswerte der positiven Seren überlappen sich in den verschiedenen Verdünnungsstufen. So wurde z.B. ein Serum mit einer Extinktion von 0,175 bei einer durchgeführten Titration einmal in einer 64-fachen Verdünnung, zum anderen in einer 128-fachen Verdünnung noch als positiv beurteilt. Ein Rückschluß von der Höhe der Extinktionswerte auf die dazugehörigen Titerstufen ist deshalb in diesem Überlappungsbereich nur mit Vorbehalt möglich. Andererseits wird deutlich, daß Seren, die unter dem angesetzten Grenztiter von 1:64 liegen, in ihrer Extinktion den Wert von 0,100 nie überschreiten. Damit ergibt sich für diese negativen Seren immer ein MONA-Wert der kleiner ist als 1,00.

4. Nachweis der Babesieninfektion des Rindes mit Hilfe eines Intradermaltests

Nach der intrakutanen Injektion der verschiedenen Antigene und Kontrollsubstanzen ergab sich in den ersten 4 Stunden p.inj. eine Hautdickenzunahme, die zwischen 1,2 und 3,0 mm lag. Bei dem nicht infizierten Kontrolltier nimmt die Hautdickenzunahme sehr schnell wieder ab und ist bei den verschiedenen Substanzen nach 32-64 Stunden nicht mehr nachweisbar. Bei den mit B. divergens infizierten Rindern beträgt die Zunahme bei den Kontrollsubstanzen nach 4 Stunden nur noch 0,3 mm. Die Zunahme der Hautdicke bei den 4 verschiedenen Antigenen

sank dagegen bis 96 Stunden p.inj. nur geringfügig (Abb. 5). Die Hautdickenzunahme betrug nach 72 Stunden im Mittel 1,6 mm für das metabolische B. rodhaini-Antigen und für das somatische B. divergens-Antigen sowie 2,5 mm für das somatische B. rodhaini-Antigen und das metabolische B. divergens-Antigen. Bei einer Hautdicke von 3,0 mm vor Versuchsbeginn ergibt sich somit eine Zunahme von 53,3 bzw. 83,3%.



IV. Besprechung der Ergebnisse

Ziel meiner Arbeit war es, an 3 experimentell mit *Babesia divergens* infizierten Rindern die Antikörperbildung zu studieren, Titerverlaufskurven mit Hilfe des indirekten Fluoreszenzantikörpertests (IFAT), des indirekten Hämagglutinationstests (IHA) und des Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) zu erstellen und eine Grenztiterbestimmung vorzunehmen. Anhand der gesammelten Erfahrung bei diesen Tieren sollten eine größere Anzahl von Rinderseren aus Südbayern auf eine Antikörperpräsenz untersucht werden, um einen Hinweis auf den Durchseuchungsgrad der Rinderpopulation in diesem Gebiet zu bekommen.

Der Nachweis von Antikörpern ist sehr wesentlich abhängig von der Empfindlichkeit der serologischen Untersuchungsmethoden. Für Tests wie dem IFAT und dem ELISA ist von Bedeutung, gegen welche Antikörper, nämlich Ig insgesamt, IgG oder IgM, das markierte Antiglobulin (Konjugat) reagiert. In allen 3 Tests konnte ich Antikörper 5 Tage nach der Infektion und 3 Tage nach dem Beginn der Parasitämie erstmals nachweisen. Auch BIDWELL und Mitarb. (1978) stellten bei experimentell mit *B. divergens* bzw. *B. major* infizierten Kälbern am 6. Tag p.i. erstmals Antikörper im ELISA, im IFAT und in der KBR fest. KRATZER (1979) erhielt bei mit *B. canis* infizierten Hunden im ELISA zumindest niedere Titer, bevor Parasiten mikroskopisch nachweisbar waren. Da es sich dabei allerdings um nur niedere Titerstufen handelte, konnte sie unspezifische Ergebnisse nicht ausschließen.

Nach der Infektion steigen die Titer in allen 3 Tests ab dem 6. Tag p.i. an und erreichen zwischen dem 20. und 40. Tag p.i. ihr Maximum. Nach einer künstlichen Infektion mit *B. bigemina* kamen ROSS und LÖHR (1968) mit dem IFAT zu gleichen Ergebnissen. Bei Infektionsversuchen mit *B. divergens* an nicht entmilzten Rindern erreichten die Titer um den 30. Tag p.i. bei Untersuchungen von BIDWELL und Mitarb. (1978) im IFAT eine Höhe von 1:2560 bis 1:5120, in der KBR von 1:128. Die Ergebnisse des ELISA gaben diese Autoren nur in Extinktionswerten an.

Sie lagen um den 20. Tag p.i. bei 3 mit *B. divergens* infizierten Kälbern zwischen 0,750 und 1,120. Bei meinen Tieren liegen die Maximaltiter im IFAT bei 1:640, im ELISA bei 1:512 bis 1:1024 und im IHA bei 1:256. Der Antikörpertiter wird im IFAT und IHA früher erreicht als im ELISA.

Da ich im IFAT ein fluoreszenzmarkiertes Antiglobulin verwendete, das gegen das Gesamt-Immunglobulin und damit auch gegen IgM-Antikörper gerichtet war, läßt sich der frühere Titeranstieg in diesem Test durch die schneller einsetzende Synthese von IgM-Antikörpern erklären. Der ELISA reagiert später, weil mit dem nur gegen IgG-Antikörper gerichteten peroxidasemarkierten Antiglobulin die Antikörper der IgM-Klasse nicht erfaßt werden. BIDWELL und Mitarb. (1978) erhielten bei der Verwendung verschiedener Konjugate Maximaltiter im Abstand von 10 Tagen. Dabei reagierte der ELISA mit einem gegen das gesamte Immunglobulin gerichteten Antiglobulin früher als der IFAT, mit dessen Konjugat nur IgG-Antikörper erfaßt werden konnten. Auch COX und TURNER (1970) stellten bei mit *B. microti* infizierten Mäusen fest, daß die IgG-Konzentration erst anstieg, wenn die Infektion aus der frischen in die latente Phase überging und keine Parasiten im Blut mehr nachgewiesen werden konnten.

Zwischen dem IFAT und dem ELISA bestehen in der latenten Phase der Infektion hinsichtlich der Sensitivität keine wesentlichen Unterschiede. BIDWELL und Mitarb. (1978) weisen darauf hin, daß der ELISA bei einer photometrischen Auswertung weniger subjektiv ist als der IFAT.

Die Titer im IHA waren generell niedriger als in den anderen beiden Tests und sanken auch sehr schnell auf eine Höhe von 1:32 ab. Bei Rind 3 war dieser Titer schon am 18. Tag p.i. wieder erreicht. Bei der Verwendung des homologen Antigens ergaben sich im IHA die gleichen Titer wie mit dem heterologen Antigen. *B. rodhaini* und *B. divergens* besitzen gemeinsame Antigene, was sich serologisch durch Kreuzreaktionen manifestiert. Auch SIBINOVIC und Mitarb. (1967)

konnten Kreuzreaktionen trotz säulenchromatographischer Auftrennung der Seren bei *B. equi*, *B. canis* und *B. rodhaini* nachweisen. DOHNA (1977) gelang dieses bei *B. galagolata*- und *B. canis*-Infektionen und KRATZER (1979) bei *B. equi*-, *B. gibsoni*-, *B. caballi*- und *B. bigemina*-Infektionen.

In allen 3 Tests kam es bald nach Erreichen der Maximaltiter zu einem Titerabfall. Die Antikörperkonzentration stabilisierte sich, doch konnten in jedem Test über einen Zeitraum von 250 Tagen Babesien-Antikörper nachgewiesen werden.

Dies bestätigt die Ergebnisse von ROSS und LÖHR (1968) mit dem IFAT, von CURNOW und CURNOW (1967) mit dem IHA, von WEILAND und KRATZER (1979) mit dem IFAT und ELISA sowie von PURNELL und Mitarb. (1976) mit dem Immuno-Enzymtest. Auch 70 Tage nach der Therapie sanken die Titer nicht ab. Bei Rind 1 stieg der Antikörpertiter in den 3 Tests nach der Entmilzung mit dem Auftreten der Parasitämie um eine bis zwei Titerstufen an. Die Vermehrung der Parasiten stellt also einen antigenen Reiz dar, auf den der Wirtsorganismus selbst dann noch mit einer vermehrten Synthese von Antikörpern reagiert, wenn die Milz als wichtiges Abwehrorgan nicht mehr zur Verfügung steht.

Ein besonderes Merkmal einer Babesieninfektion besteht darin, daß Tiere, die eine Infektion überstehen, keine vollkommene Immunität erwerben und Parasitenträger bleiben. Durch die Entmilzung von Rind 2 am 11. Tag p.i. und von Rind 1 am 164. Tag p.i. konnte ich diesen Nachweis führen. Bei beiden Tieren entwickelte sich am 7. bzw. 8. Tag nach der Splenektomie eine Parasitämie. LEWIS und WILLIAMS (1979) beschrieben eine Übertragungsmöglichkeit von *B. divergens* auf Gerbils (*Meriones unguiculatus*). Mit der Übertragung von Blut des unbehandelten Rindes 2 am 243. Tag p.i. setzte ich bei diesen Tieren eine Infektion mit der bisher als rinderspezifisch geltenden Babesienart und konnte *B. divergens* im Blutaussstrich nachweisen. LEWIS und WILLIAMS (1979) verwendeten bei ihren Infektionsversuchen Rinderblut, in dem Erreger mikroskopisch nachweisbar waren und infizierten

die Gerbils mit etwa 5×10^8 parasitenhaltigen Erythrozyten. Dagegen war bei Rind 2 der Parasitennachweis seit dem 27. Tag p.i. nicht mehr möglich.

Mit dem Blut von Rind 1 und Rind 3 gelang nach einer Berenil-Therapie ($3 \times 7,5$ mg/kg im Abstand von 2 Tagen) die Infektion von Gerbils nicht. Bei dieser Dosierung ist also eine Sterilisatio magna erreicht, die Tiere sind nicht mehr Parasitenträger.

Die Entmilzungen und das Angehen der *B. divergens*-Infektion in Gerbils haben gezeigt, daß Rinder mit einem Serumtiter von 1:64 im ELISA, 1:32 im IHA und 1:40 im IFAT noch Parasitenträger sind, wenn keine Therapie durchgeführt worden ist. Diese Tiere aus enzootischen Gebieten stellen ein Erregerreservoir dar; sie können für die Verbreitung der Babesiose sorgen, wenn sie in bisher freie Gebiete gelangen, in denen der geeignete Vektor vorhanden ist. Außerdem ist daran zu denken, daß Babesien sich auch bei unsachgemäßen Arbeiten mit der Injektionsnadel übertragen lassen. Bei mit *B. canis* bzw. *B. gibsoni* infizierten Hunden kamen WEILAND und KRATZER (1979) zu ähnlichen Ergebnissen.

Bei der Untersuchung von 1291 Rinderseren aus Südbayern im ELISA und im mit homologem und heterologem Antigen durchgeführten IHA ergab sich eine Übereinstimmung von 77,8 und 85% zwischen den verschiedenen Tests. Diese Übereinstimmung ist insofern zufriedenstellend, als sie vergleichende Untersuchungen von GOLDMANN und BUKOWSKY (1975) übertrifft; sie erreichten bei einem Vergleich zwischen der Gelpräzipitation und dem IFAT nur eine Übereinstimmung von 72%. Weitere Vergleichsuntersuchungen liegen leider nicht vor. Die Diskrepanz kann zum Teil dadurch erklärt werden, daß mit dem ELISA nur Antikörper der Immunglobulin Klasse G nachgewiesen werden, während im IHA möglicherweise IgM-Antikörper reagieren. Bei einem Vergleich der einzelnen Titerstufen ergibt sich, daß auch bei höheren Titerstufen im ELISA (1:128-1:256) noch einzelne Seren

im IHA negativ reagierten, während im ELISA negative Seren im IHA Titer von 1:32 bzw. 1:64 brachten.

Mit den Ergebnissen in den einzelnen Landkreisen konnte der Verdacht von DENNIG, LEHNER und TEUBNER (1974) bestätigt werden, daß hier Babesieninfektionen vorkommen können. In den Landkreisen Bad Tölz, Oberallgäu und Rottal-Inn beträgt die Infektionsrate zwischen 41,9 und 43,9% bzw. 22 - 26,5%, wenn nur die Ergebnisse Berücksichtigung finden, die durch einen anderen Test bestätigt werden. In den anderen Landkreisen liegen die Ergebnisse mit 33,0 bzw. 16-20% etwas niedriger. Diese überraschend hohen Zahlen lassen darauf schließen, daß es sich hier um enzootische Gebiete handelt. ADAM und BLEWETT (1977) weisen darauf hin, daß in diesen Gebieten klinisch manifeste B. divergens-Fälle selten sind.

Nach den Erfahrungen bei den experimentell infizierten Rindern muß davon ausgegangen werden, daß nicht behandelte Tiere, bei denen ein Antikörpertiter nachgewiesen werden konnte, der mindestens den festgesetzten Grenztiter erreichte, Parasitenträger sind. Hier wird nun notwendig sein, eine Erregerisolierung durchzuführen bzw. einen metabolischen Antigennachweis mit dem ELISA zu führen.

Die Möglichkeit, Antikörperkonzentrationen mit der MONA-Technik stufenlos zu bestimmen, wird der ELISA-Technik gerecht; sie bietet dem Kliniker ein anschauliches Ergebnis, da ein negatives Serum immer einen MONA-Wert von kleiner als 1,00 hat. Als Limit für die Extinktion eines normalen Standardserums setzte ich einen Wert von 0,100 ein, da bei mehrfachen Ansätzen von Seren, die sowohl im IFAT als auch im IHA negativ reagierten, dieser Wert im ELISA nicht überschritten wurde. Dieses steht im Gegensatz zu RUITENBERG und VAN KNAPEN (1977) sowie zu VOLLER und Mitarb. (1977), die in ihren Arbeiten eine Extinktion von 0,200 grundsätzlich als negativen Grenzwert einsetzten.

FELGNER (1978) ist der Auffassung, daß die Extinktion eines normalen Sammelserums als Grenze der Negativität angesehen und für jeden Test neu bestimmt werden sollte. Bei einem Vergleich zwischen den Titerstufen und den Extinktionen mit den dazugehörigen MONA-Werten ist deutlich, daß bei den hohen MONA-Werten mit ziemlicher Sicherheit auf die dazugehörigen Titerstufen geschlossen werden kann. Bei den niedrigeren Titerstufen ist aber nur ein vorsichtiger Rückschluß möglich, da es hier zu Überlappungen zwischen den MONA-Werten und den Titerstufen kommen kann. Dieses entspricht Erfahrungen von BULLOCK (1977) mit dem ELISA.

Neben der Bestimmung von Antikörpern gegen *B. divergens* mittels serodiagnostischer Untersuchungsmethoden und dem Nachweis des Antigens im Tierversuch mit Gerbils kann mit einem Intradermaltest eine Babesieninfektion nachgewiesen werden, wenn die Tiere nicht behandelt worden sind. Bei meinen experimentell infizierten Rindern konnte ich sowohl mit dem homologen als auch mit dem heterologen Antigen eine signifikante Hautdickenzunahme feststellen. Das somatische *B. rodhaini*-Antigen und das metabolische *B. divergens*-Antigen scheinen für den Intradermaltest geeigneter zu sein als die beiden anderen Antigene, da es zu einer stärkeren Hautdickenzunahme kommt. Bei mit *B. equi* infizierten Pferden konnten BANERJEE und Mitarb. (1977) mit homologem somatischem und metabolischem Antigen eine Zunahme der Hautdicke beobachten, die meinen Ergebnissen entspricht. Da bei der intrakutanen Tuberkulinprobe eine Hautdickenzunahme von über 2,0 mm unter Berücksichtigung etwaiger klinischer Reaktionen bei der Beurteilung nach mindestens 72 und spätestens 96 Stunden als positiv angesehen wird (ROSENBERGER, 1970), halte ich zumindest das metabolische *B. divergens*-Antigen und das somatische *B. rodhaini*-Antigen für geeignet, eine Infektion mit *B. divergens* bei Rindern zu erkennen. Dabei müssen weitere Untersuchungen folgen, die den Einfluß einer Therapie erfassen. Möglicherweise bleibt der Intradermaltest auch nach einer Therapie trotz eines vollkommenen Verschwindens der Erreger positiv.

V. Zusammenfassung

An 3 experimentell mit *Babesia divergens* infizierten Rindern wurden über einen Zeitraum von 8 1/2 Monaten Titerverlaufskurven im indirekten Fluoreszenzantikörpertest (IFAT), im indirekten Hämagglutinationstest (IHA) und im Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) erstellt und eine Grenztiterbestimmung durchgeführt. Unter Verwendung von somatischem Antigen sowohl von *Babesia divergens* als auch von *Babesia rodhaini* ließen sich in den 3 serologischen Untersuchungsmethoden spezifische Antikörper gegen *Babesia divergens* nachweisen.

Bei 463 von 1291 Rinderseren aus 7 Landkreisen Südbayerns gelang mit dem ELISA und mit dem mit heterologem und homologem Antigen durchgeführten IHA der Nachweis einer Babesien-Infektion. Die Ergebnisse für die verschiedenen Landkreise lagen zwischen 32,0 und 43,9%.

Mit der MONA-ELISA-Technik wird die Möglichkeit einer stufenlosen Antikörperbestimmung für die Serodiagnostik der Babesiose beschrieben; sie erscheint für die praktische Anwendung bei Felduntersuchungen geeignet.

Auch ein erstmals durchgeführter Intradermaltest sowie die Durchführung des Tierversuchs an Gerbils (*Meriones unguiculatus*) sind Möglichkeiten, bei unbehandelten Tieren eine *Babesia divergens*-Infektion nachzuweisen.

REIF, L.: Serological diagnosis of Babesia divergens infection in cattle by means of the indirect fluorescent antibody test, the indirect haemagglutination test and the enzyme-linked immunosorbent assay

Summary

Over a period of 8 1/2 months the antibody formation to Babesia divergens was studied in 3 experimentally infected cattle by means of the indirect fluorescent antibody test (IFAT), the indirect haemagglutination test (IHA) and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). According to these results titers ranging from 1:32 (IHA) and 1:64 (ELISA) and higher were regarded as positive. Using somatic antigens either of Babesia divergens or of Babesia rodhaini specific antibodies to Babesia divergens were detectable by these three tests.

1291 sera of cattle from 7 districts of southern Bavaria were examined in the ELISA and in the IHA, using heterologous or homologous antigen. 463 of them reacted seropositive. The occurrence of antibody to Babesia divergens in the cattle population of these districts ranged from 32,0 to 43,9%.

A stepless antibody determination to Babesia divergens is described with the MONA-ELISA technique. This technique proved to be suitable for serological field surveys of babesiosis.

An intradermal skin test, which was carried out for the first time and the inoculation of blood to gerbils (Meriones unguiculatus) in order to reisolate the parasites were suitable for the detection of Babesia divergens infections in untreated cattle.

VI. Literaturverzeichnis

- Adam, K.M., D.A. Blewett (1978): A serological survey for Babesia in cattle in Scotland. I. Assessment of the method by the results from the outlying islands.
Ann. Trop. Med. Parasit. 72, 405-415
- Adam, K.M., D.A. Blewett (1978): A serological survey for Babesia in cattle in Scotland. II. The occurrence of antibody in the population and the distribution of infected herds.
Ann. Trop. Med. Parasit. 72, 417-428
- Ambroise-Thomas, P., P.T. Desgeorges (1978): Diagnostic immunoenzymologie (ELISA) des maladies parasitaires par une micro-méthode modifiée.
Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé 56, 609-613
- Avrameas, S., B. Taudou, S. Chuilon (1969): Glutaraldehyd, cyanuric chloride and tetraazotized o-dianisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test.
Immunochemistry 6, 67-76
- Banerjee, D.P., B. Sing, O.P. Gautam, S. Saryp (1977): Cell-mediated immune response in equine babesiosis.
Trop. Anim. Hlth Prod. 9, 153-158
- Becht, H. (1968): Properties of erythrocytes stabilized with sulfo-salicylic acid and their use in an indirect hemagglutination test with influenza virus RNP-antigen.
J. Immunol. 101, 18-22
- Bidwell, D.E., P. Turp, L.P. Yoyner, R.C. Payne, R.E. Purnell (1978): Comparison of serological tests for Babesia in British cattle.
Vet. Rec. 103, 446-449
- Blewett, D.A., K.M. Adam (1978): A serological survey for Babesia in cattle in Scotland. III. The rates of acquisition and loss of antibody to Babesia and their effects on observed levels of antibody incidence.
Ann. Trop. Med. Parasit. 72, 513-522
- Bullock, S.L., K.W. Walls (1977): Evaluation of some of the parameters of the enzyme-linked immunospecific assay.
J. infect. Dis. 136, 279-285
- Burridge, M.J., C.D. Kimber, N. McHardy (1973): Detection of antibodies to Babesia bigemina in dried blood samples using the indirect fluorescent antibody test.
Ann. Trop. Med. Parasit. 67, 191-195

- Cox, F.E.G., S.A. Turner (1970): Antibody levels in mice infected with *Babesia microti*.
Ann. Trop. Med. Parasit. 64, 167-173
- Curnow, J.A., B.A. Curnow (1967): An indirect haemagglutination test for the diagnosis of *Babesia argentina* infection in cattle.
Austr. Vet. J. 43, 286-290
- Danailov, J., G. Gräfner, P. Betke, H. Blum (1965): Epizootologische und morphologische Untersuchungen über die Rinder-Piroplasmose in Mecklenburg.
Mh. Vet. Med. 20, 45-50
- Dennig, H.K., M. Lehner, F. Teubner (1974): Ein Beitrag zum Vorkommen der Rinderbabesiose im südbayerischen Raum.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 87, 190-193
- Donnelly, J., L.P. Joyner, P.J. Crossmann (1972): The incidence of *Babesia divergens* infection in a herd of cattle as measured by the indirect immunofluorescent antibody test.
Res. Vet. Sci. 13, 511-514
- Engvall, E., P. Perlmann (1972): Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes.
J. Immunol. 109, 129-135
- Enigk, K., K. Friedhoff, S. Wirahadiredja (1963): Die Piroplasmen der Wiederkäuer in Deutschland.
Dt. Tierärztl. Wschr. 70, 422-426
- Felgner, P. (1978): Stick-ELISA, a new technique of heterogenous enzyme-linked immunosorbent assay. I. Description of the technique.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 240, 112-117
- Felgner, P. (1978): Stick-ELISA, a new technique of heterogenous enzyme-linked immunosorbent assay. II. Application of Stick-ELISA to antigen of various infective agents.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 240, 118-122
- Felgner, P. (1978): Stepless antibody determination with the Stick-ELISA technique. Results expressed as multiple of normal activity (MONA).
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 242, 100-105
- Goerttler, V. (1929): Verbreitung und Bekämpfung der Rinderpiroplasmose in Deutschland.
Arch. wiss. prakt. Tierheilk. 59, 248-286

- Goldmann, M., E. Bukowsky (1975): Extraction and preliminary use for diagnosis of soluble precipitation antigens from *Babesia bigemina*.
J. Protozool. 22, 262-264
- Goodger, B.V. (1971): Preparation and assessment of purified antigens in the passive haemagglutination test for bovine babesiosis.
Austr. Vet. J. 47, 251-255
- Goodger, B.V., D.F. Mahoney (1974): Evaluation of the passive haemagglutination test for diagnosis of *Babesia argentina* in cattle.
Austr. Vet. J. 50, 246-249
- Hahn, H. (1974): Zelluläre antibakterielle Immunität.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 227, 184-195
- Herbert, W.J. (1967): Passive Haemagglutination.
In: D.M. Weir: Handbook of experimental immunology, 720-751, Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Hirato, K., N. Ninomiya, Y. Uwano, T. Kutil (1945): Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmiasis.
Jap. J. Vet. Sci. 7, 204-205
- Jackschath, E. (1901): Die Malaria der Rinder in Deutschland.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 29, 585-589
- Jacob, E. (1939): Die Verbreitung der Rinderpiroplasmose im Gau Niedersachsen.
Z. Infekt.-Kr. Haustiere 55, 117-133
- Jungmann, R. (1966): Die Piroplasmose des Rindes in der DDR. Ein Beitrag zur Epizootologie, Therapie und Prophylaxe.
Mh. Vet. Med. 21, 259-266
- Kimber, C.D., M.J. Burridge (1972): The indirect fluorescent antibody test for experimental east coast fever (*Theileria parva* infection of cattle). Evaluation of dried blood samples as a source of antibody.
Res. Vet. Sci. 13, 133-135
- Kossel, H., A. Weber, W. Schütz, H. Messner (1904): Über die Hämoglobininurie der Rinder in Deutschland.
Arb. Gesundh.-Amt (Berl.) 19, 1-77
- Kratzer, I. (1979): Die Brauchbarkeit der *Babesia rodhaini*-Antigene zum Nachweis von Babesien-Infektionen im ELISA.
Vet. med. Diss., München
- Lewis, D., H. Williams (1979): Infection of the Mongolian gerbil with the cattle piroplasm *Babesia divergens*.
Nature 278, 170-171

- Löhr, K.F., J.P.J. Ross (1969): Capillary tube agglutination test for the detection of *Babesia bigemina* antibody.
Tropenmed. Parasit. 20, 287-292
- Lopez, G., R.A. Todorovic (1978): Rapid latex agglutination (RLA) test for the diagnosis of *Babesia argentina*.
Vet. Parasit. 4, 1-9
- Mackanness, G.B., R.V. Blanden (1967): Cellular immunity.
Progr. Allergy 11, 89-105
- Mahoney, D.F. (1977): *Babesia* of domestic animals.
In: J.P. Kreier: Parasitic protozoa IV, 1-52. Academic Press, New York
- Mayr, A., P.A. Bachmann, B. Bibrack, G. Wittmann (1977): Virologische Arbeitsmethoden. II. Serologie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Nevermann, L. (1901): Der Parasit des "Blutharnens" der Rinder.
Berl. Tierärztl. Wschr. 17, 645-648
- Purnell, R.E., D.J. Hendry, D.E. Bidwell, P. Turp (1976): Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to *Babesia divergens* in cattle.
Vet. Rec. 99, 102-105
- Purnell, R.E., D.W. Brocklesby, D.J. Hendry, E.R. Young (1976): Separation and recombination of *Babesia divergens* and *Ehrlichia phagocytophila* from a field case of redwater from Eire.
Vet. Rec. 99, 415-418
- Ristic, M., S. Sabinovic (1964): Serologic diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test.
Res. Vet. Sci. 9, 557-562
- Ristic, M., G.E. Lewis jr. (1977): *Babesia* in man and wild and laboratory-adapted mammals.
In: J.P. Kreier: Parasitic Protozoa IV, 53-76. Academic Press, New York
- Rosenberger, G. (1970): Krankheiten des Rindes.
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- Ross, J.P.J., K.F. Löhr (1968): Serologic diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test.
Res. Vet. Sci. 9, 557-562

- Ruitenberg, E.J., F. van Knapen (1977): The enzyme-linked immuno-sorbent assay and its application to parasitic infections.
J. Infect. Dis. 136, 267-273
- Sibinovic, K.H., R. Mc Lead, M. Ristic, S. Sibinovic, W.H. Cox (1967): A study of some of the physical, chemical and serological properties of antigens from sera of horses, dogs and rats with acute babesiosis.
J. Parasit. 53, 919-923
- Todorovic, R.A., K.L. Kuttler (1974): Babesiosis card agglutination test.
Am. J. Vet. Res. 35, 1347-1350
- Todorovic, R.A. (1975): Serological diagnosis of babesiosis: A review.
Trop. Anim. Hlth Prod. 7, 1-14
- Todorovic, R.A., R.F. Long (1976): Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for the diagnosis of Babesia spp. infections in Colombian cattle.
Tropenmed. Parasit. 27, 169-181
- Urbanek, D., F. Rothe (1979): Mechanismen der immunologischen Infektionsabwehr.
Mh. Vet. Med. 34, 138-145
- Weiland, G., H. Graf zu Dohna (1978): Die Brauchbarkeit des Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) zum Nachweis von Babesien-Antikörpern in Hochimmunsereen mit Hilfe von Ektoantigenen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 33-35
- Weiland, G. (1978): Der Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) als neue serodiagnostische Methode zum Nachweis parasitärer Infektionen.
Münch. Med. Wschr. 120, 1457-1460
- Weiland, G., I. Kratzer (1979): Fluoreszenz- und enzymserologische Untersuchungen zum Nachweis der latenten Hundebabesiose.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 398-400
- Zuckermann, A., M. Ristic (1968): Blood parasite antigens and antibodies.
In: Weinmann and Ristic: Infectious blood diseases of man and animals, 79-122. Academic Press, New York.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Hilfe sowie die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut danken.

Desgleichen gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. G. Weiland für die jederzeit gern gewährte Anleitung und Unterstützung bei der Anfertigung meiner Arbeit.

Lebenslauf

Am 14. September 1951 wurde ich als erster Sohn des Kaufmanns Anton Reif und seiner Frau Erna geb. Kranen in Moers geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule und der Realschule trat ich in das Staatliche Gymnasium in Moers ein und legte dort im Juni 1971 die Reifeprüfung ab.

Vom 1. Juli 1971 bis 31. Dezember 1972 diente ich bei der Sanitätstruppe der Bundeswehr.

Im Wintersemester 1973 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilian Universität München, das ich im Oktober 1978 abschloß.

Seit Dezember 1978 bin ich am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit der Anfertigung meiner Dissertation beschäftigt.

